

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie životního prostředí



EKOTOXICITA NANOMATERIÁLŮ

Ecotoxicity of nanomaterials

Bakalářská práce

Nad'a Viltová

Vedoucí bakalářské práce: Doc., Ing. Vladimír Kočí, Ph.D.

Praha, 2011

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 26. 5. 2011

.....
Podpis

Ráda bych poděkovala své konzultantce Ing. Tereze Sovové za velkou ochotu, trpělivost, cenné rady při psaní této bakalářské práce, za pomoc v laboratoři a za čas, který mi věnovala. Také bych ráda poděkovala svému školiteli Doc., Ing. Vladimíru Kočímu, Ph.D., za inspiraci a možnost uskutečnit bakalářskou práci.

Dále bych chtěla poděkovat rodině a panu Jiřímu Počtovi za podporu během studia.

Souhrn

V posledních letech dochází k rychlému rozvoji výzkumu v oblasti nanotechnologií a roste i nebezpečí emisí nanomateriálů do životního prostředí a riziko jejich nepříznivého působení. Existuje velmi málo informací o chování a účincích nanomateriálů v životním prostředí, ale doposud provedené studie naznačují vzrůstající míru nepříznivých účinků nanomateriálů s klesající velikostí částic.

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit toxicitu nanočástic CeO_2 o velikosti 47,7 nm a 2,1 nm CeO_2 na zelených, sladkovodních řasách *Desmodesmus subspicatus*. Dále byl zkoumán vliv přídavku surfaktantu na toxicitu obou látek. Výsledky ukázaly, že částice o velikosti 2,1 nm vykazovaly vyšší toxicitu než částice s větší velikostí, což je v souladu s informacemi nalezenými v literatuře. Po přídavku surfaktantu byl pozorován nárůst toxicity obou forem.

Abstract

Recently, nanotechnology has gained a lot of interest and the likelihood of emission of nanomaterials into the environment increases as well as the risk of its adverse effects. There is very little information about the behaviour and effects of nanomaterials in the environment, but so far the studies indicate an increasing rate of adverse effects of nanomaterials with decreasing particle size.

The aim of this work was to determine the toxicity of nanoparticles of CeO_2 of the size of 47,7 nm and 2,1 nm on a green, freshwater algae *Desmodesmus subspicatus*. Furthermore, the influence of surfactant addition on the toxicity of both substances was evaluated. The results showed that the particle of 2,1 nm showed a higher toxicity than the bigger particles, which is consistent with that was found in the literature. After addition of surfactant, an increase of toxicity was observed increase for both forms

Klíčová slova

ekotoxická, nanomateriály, nanočástice, řasy, *Desmodesmus subspicatus*, surfaktant

Keywords

ecotoxicity, nanomaterials, nanoparticles, algae, *Desmodesmus subspicatus*, surfactant

Seznam symbolů a zkratek

CNT	uhlíková nanotrubiice
NM	nanomateriály
SDS	dodecyl sulfát sodný
THF	tetrahydrofuran
LOEC	nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky
NOEC	nejvyšší koncentrace testovaného vzorku nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky
EC50	střední účinná koncentrace (koncentrace zkoušené látky mající za následek 50% efekt ve vztahu ke kontrolnímu vzorku)
R^2	koeficient determinace

Obsah

1. Úvod	8
2. Teoretická část	9
2.1. Nanomateriály	9
2.1.1. Rozdělení nanomateriálů	9
2.1.2. Rozdílné vlastnosti NM oproti konvenčním materiálům	10
2.1.3. Příprava nanomateriálů	11
2.2. Nanomateriály v životním prostředí	11
2.2.1. Způsob vstupu nanomateriálů do životního prostředí	11
2.2.2. Faktory ovlivňující chování NM v životním prostředí	12
2.2.3. Důsledky agregace	13
2.2.4. Chování NM ve vodním prostředí po přidání surfaktantu	14
2.3. Toxicita nanomateriálů	16
2.3.1. Uhlíkaté nanomateriály	16
2.3.2. Kovové nanomateriály a jejich sloučeniny	16
2.3.3. Kvantové tečky	17
3. Experimentální část	18
3.1. Řasový test toxicity	18
3.1.1. Použitý řasový kmen	18
3.1.2. Kultivace zásobní řasové kultury	18
3.1.3. Živné médium	18
3.1.4. Toxikant	19
3.1.5. Surfaktant	20
3.1.6. Pracovní postup	20
3.1.7. Vyhodnocení výsledků [19]	21
4. Výsledky a diskuze	23
4.1. Řasový test toxicity pro surfaktant	23
4.2. Řasový test toxicity pro 47,7 nm a 2,1 nm CeO ₂	24
4.3. Řasový test toxicity pro 47,7 nm a 2,1 nm CeO ₂ se surfaktantem	27
4. 4. Průběh řasového testu toxicity	29
5. Závěr	30

6. Seznam použité literatury	31
7. Příloha.....	34
7.1. Řasový test toxicity pro 47,7 nm a 2,1 nm CeO ₂	34
7.2. Řasový test toxicity pro 47,7 nm a 2,1 nm CeO ₂ se surfaktantem.....	36

1. Úvod

Nanotechnologie je v současnosti jeden z nejvíce se rozvíjejících oborů. Nanomateriály nacházejí uplatnění v mnoha oborech lidské činnosti a stále častěji se uplatňují i v produktech běžné denní potřeby. I přesto výzkum v oblasti bezpečnosti nanotechnologií zaostává za jejich vlastním rozvojem a v současné době je k dispozici pouze velmi málo relevantních informací o chování a účincích nanomateriálů v životním prostředí. Z hlediska složení se nejedná o nové látky, ovšem právě rozměry těchto částic jsou tím, co je odpovědné za nové či lepší vlastnosti těchto látek z hlediska technologického a co může ovlivňovat i jejich vliv na životní prostředí.

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout informace týkající se chování nanomateriálů v životním prostředí při různých podmínkách a informací týkajících se toxicity nanomateriálů na různé organismy. Dále provést řasové testy toxicity nanočástic CeO_2 různých velikostí a porovnat míru toxicity daných látek po přidání surfaktantu. Jako testovací organismus byly použity řasy *Desmodesmus subspicatus*.

2. Teoretická část

2.1. Nanomateriály

Nanomateriály jsou látky, které mají 1 - 100 nm (0,001 – 0,1 μm) v průměru, a disponují rozdílnými vlastnostmi v porovnání s makroskopickými formami chemicky identických materiálů. Nanoobjekty jsou nanomateriály, jejichž vnitřní struktura má alespoň v jednom rozměru velikost od 1 nm do 100 nm. Pokud nanoobjekty dosahují nanorozměrů ve třech souřadných osách, nazývají se nanočástice. Nanovlákná dosahují nanorozměrů ve dvou souřadných osách a nanodesky pouze v jedné souřadné ose. [1,2]

2.1.1. Rozdělení nanomateriálů

Nanomateriály lze rozdělit do několika různých skupin: uhlíkové nanomateriály; kovové nanomateriály a jejich oxidy; polovodiče včetně kvantových teček a dendrimery. [3,4]

2.1.1.1. Uhlíkové nanomateriály

Uhlíkové nanomateriály jsou charakterizovány přítomností převážně stabilních kovalentních vazeb dávající uhlíkovým materiálům vysokou tepelnou vodivost. Patří mezi ně nanodiamanty, fullereny, uhlíkové nanotrubičky (CNT) a jiné jejich deriváty. Uhlíkové materiály se užívají na výrobu plastů, katalyzátorů, baterií a elektrod palivových článků, superkondenzátorů, ortopedických implantátů, vodivých povlaků, lepidel, komponentů v elektronice a používají se v leteckém i automobilovém průmyslu. Ve vodním prostředí jsou předmětem srážek a případné agregace v důsledku jejich hydrofobity. To omezuje jejich využití ve vodní a biomedicínské aplikaci. [3,4,5]

2.1.1.2. Kovové nanomateriály a jejich oxidy

Z kovů se v nanoformě používá zejména (Au), stříbro (Ag), měď (Cu), platina (Pt), wolfram (W), nikl (Ni), palladium (Pd), indium (In), molybden (Mo) a další. Vyznačují se svojí pevností a superelasticitou, a mají výborné elektrokatalytické vlastnosti. U stříbra se využívá zejména jeho antibakteriálních účinků ve farmaceutickém a textilním průmyslu. [3,9]

Z oxidů kovů nanomateriálů jsou to pak zejména jednoduché oxidy (ZnO, TiO₂, CeO₂, Fe₂O₃, CuO atd.) a podvojně oxidy (BaTiO₃, LiCoO₂ a InSnO). Oxidy kovů se používají především pro svou vysokou tvrdost, tepelnou stabilitu a chemickou odolnost. Kromě toho mají oxidy nanomateriálů velmi dobré optické, elektrické a magnetické vlastnosti. V současné době je oxid titaničitý a zinečnatý používán v kosmetice a na ochranu proti slunečnímu záření. Oxid ceričitý se využívá hlavně jako katalyzátor spalování v dieselových palivech, v solárních článcích, v plynových senzorech a v kyslíkových čerpadlech. Oxid železitý je používán pro výrobu pigmentů barev a to hlavně pro barvení plastů, kosmetiky a potravin. [3,21] Oxid měďnatý má vynikající tepelnou vodivost a používá se ve strojírenství. [23]

2.1.1.3. Kvantové tečky

Další skupinu nanomateriálů tvoří polovodičové krystaly známé jako kvantové tečky. Kvantové tečky mají reaktivní jádro, které řídí jejich optické vlastnosti, a tato jádra mohou být tvořena z kovů nebo z polovodičů, jako je selenid kademnatý (CdSe), telurid kademnatý (CdTe), selenid zinečnatý (ZnSe) nebo fosfid india (InP). Oxid křemičitý obklopuje jádro a chrání ho před oxidací. V dnešní době se používají výhradně v medicíně (cílený transport léčiv: kotvení biologicky aktivních látek na povrchy anorganických látek) a bude možno je využít v solárních článcích a ve fotonice. [4]

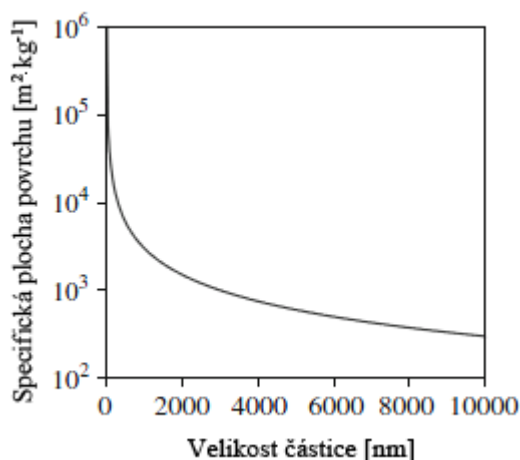
2.1.1.4. Dendrimery

Jedná se o multifunkční polymery, jejichž velikost, topologie, flexibilita a molekulová hmotnost může být ovlivňována. Používají se na výrobu nanolatemu, chemických senzorů, barevných brýlí, modifikovaných elektrod, hydrogelů a také při podávání léků.[4]

2.1.2. Rozdílné vlastnosti NM oproti konvenčním materiálům

Oproti konvenčnímu materiálu, který má méně jak 1 % atomů na povrchu, nanomateriál může mít až 90 % atomů na svém povrchu. S rostoucí velikostí částic počet povrchových atomů klesá (viz. Obr.1). Pro částice o velikosti 10 nm platí, že má okolo 15 % povrchových atomů, 50 nm částice má 6 % povrchových atomů. Tento

nárůst povrchových atomů vede ke změnám fyzikálních a chemických vlastností. [31,17]



Obr. 1: :Vztah mezi specifickou plochou povrchu a velikostí částice

Nanomateriály jsou proto více reaktivní. Díky své vysoké reaktivitě mají nanomateriály větší aktivitu při katalytických procesech. [17,18]

2.1.3. Příprava nanomateriálů

Při výrobě nanomateriálů se používají dvě základní metody: top-down a bottom-up.

Vytváření nanomateriálů zmenšováním struktury již existujícího materiálu je metoda top-down, někdy označovaná jako fyzikální přístup. Vytváření nanomateriálů z menších jednotlivých částí je metoda Bottom-up, někdy označovaná jako chemický přístup. [3,9]

2.2. Nanomateriály v životním prostředí

Nanosystémy představují specifický typ koloidně disperzních soustav. [1,2] Disperzní systém je soustava obsahující disperzní podíl, rozptýlený ve formě částic v disperzním prostředí. V roztocích představuje disperzní prostředí rozpouštědlo a disperzní podíl rozpuštěná látka. [20]

2.2.1. Způsob vstupu nanomateriálů do životního prostředí

Zvýšená produktivita nanomateriálů vede k větší pravděpodobnosti uvolnění do životního prostředí a k větší pravděpodobnosti výskytu nežádoucích účinků v životním prostředí. Nanomateriály pronikají do životního prostředí neúmyslnými úniky

z výrobních zařízení (atmosférická emise, kapalné a tuhé odpady) nebo také záměrně. Záměrné uvolňování zahrnuje použití nanomateriálů k sanaci kontaminovaných půd, včetně využití nanočástic železa k sanaci podzemních vod. V poměru k jejich použití vstupují do životního prostředí nanočástice vyskytující se v barvách, tkaninách, v kosmetice a třeba v prostředcích k ochraně proti slunečnímu záření. [4,10]

2.2.2. Faktory ovlivňující chování NM v životním prostředí

V koloidní chemii zůstávají částice rozptýleny nebo tvoří agregáty. Rychlost agregace částic v kapalném mediu částečně závisí na frekvenci srážky částice-částice (způsobené Brownovým pohybem), na energii srážky, na přitažlivě-odpudivých silách zúčastněných částic (van der Waalsovy a elektrostatické síly), na vlastnostech těchto částic a na interakci s jinými koloidními materiály. [5,15]

Disperze částice pod 100 nm by teoreticky měly být stabilní, protože částice jsou rozptýleny Brownovým pohybem a odpudivými elektrostatickými silami. V reálném prostředí ale bude agregaci nanomateriálů ovlivňovat mnoho protichůdných faktorů. [4,10]

Agregační procesy nanomateriálů jsou závislé zejména na iontové síle, pH, přítomnosti organických látek, koncentraci částic a velikosti částic. [15,18]

2.2.2.1. Koncentrace částic

Při vyšší koncentraci částic je agregace rychlejší v důsledku zvýšené pravděpodobnosti srážek mezi částicemi. [30]

Např. Agregace TiO_2 a CeO_2 na částice velikosti mikrometrů proběhla v mořské vodě do desítek minut i při nízkých koncentracích (10 mg/l). Při vyšších koncentracích částic byla míra agregace větší a samozřejmě v sedimentech je očekávána koncentrace částic ještě vyšší. [31]

2.2.2.2. Přítomnost organické látky

Přírodní organické látky vznikají rozkladem rostlinných a živočišných tkání v životním prostředí. Mezi hlavní složky přírodních organických látek patří huminové látky. [26] Přírodní organická látka má stabilizující účinek na nanočástice v roztoku, obalí nanočástici a ta spíše zůstává rozptýlena nežli by podlehla agregaci. [5] Např.

k rozptylu dochází přidavkem záporně nabitých huminových kyselin k pozitivně nabitě minerální nanočástici v přírodních sladkých vodách. [10]

2.2.2.3. pH prostředí a iontová síla

Ve vodních systémech může pH roztoku a přítomnost adsorbujících molekul a iontů ovlivnit povrchový náboj nanomateriálů, a tudíž ovlivnit agregaci. Agregace nanočástic se očekává, pokud je pH blíže k izoelektrickému bodu, náboj částice je redukován a následné odpudivé síly jsou menší. [11,18]

Iontová síla popisuje vzájemné působení částic v roztoku obsahujíc kationty a anionty. Přidáním soli do média vzroste iontová síla, ionty se budou kumulovat u povrchu rozptýlených částic a zastíní část jejich povrchového náboje NM. Omezí se tím odpudivé elektrostatické síly mezi částicemi, které se mohou k sobě více přiblížit a následně při srážkách mezi částicemi ve větší míře dochází k agregaci částic. Agregace v mořské vodě je tedy více pravděpodobná než vodě sladké. [10]

2.2.3. Důsledky agregace

2.2.3.1. Adsorpční jevy

Agregace může mít za následek uložení materiálů do organismu ve vodním prostředí. V některých případech dochází k adsorbování nanočástic na vnější povrch organismu. Nanočástice působí na organismus i přes vnější povrch. Např. se tyto procesy podílejí na toxicitě TiO_2 u pstruhů. [10]

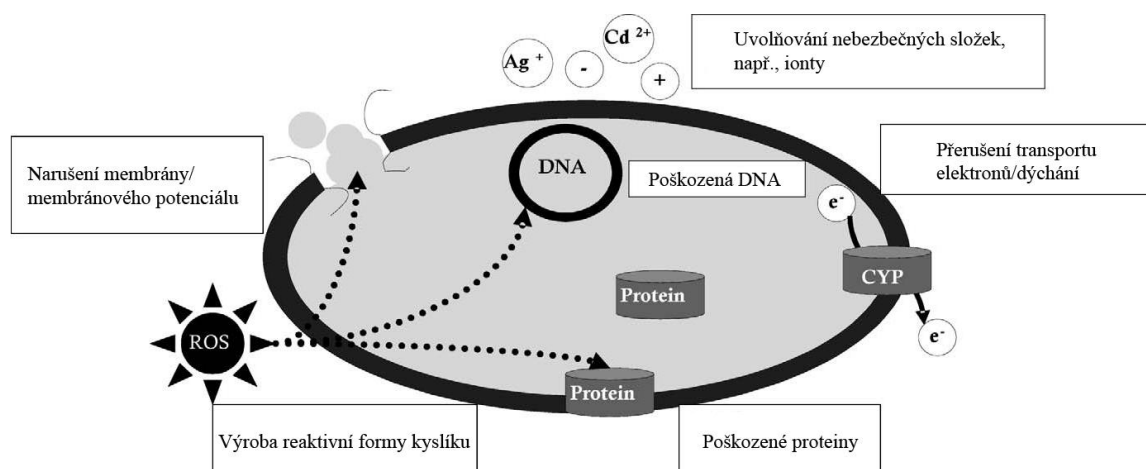
Obdobné adsorpční jevy mohou být aplikovány na rozhraní fáze pevné a kapalné látky nebo na rozhraní fáze plynu a kapaliny, na těchto rozhraních se vyskytuje vyšší koncentrace nanočástic.

Tyto adsorpční jevy nezabrání bioakumulaci nanočástic v organismech. [10,12]

2.2.3.2. Mechanismus toxicity

Přesný mechanismus toxicity nanočástic je do značné míry neznámý. [7] Nanočástice mohou vstoupit do buněk difúzí přes buněčné membrány, stejně jako prostřednictvím endocytózy. Mechanismy toxicity nanomateriálů nebyly ještě zcela objasněny, ale ve větší míře zahrnují narušení membrán nebo membránového potenciálu, oxidaci

bílkovin, genotoxicitu, přerušení energie transdukce, formování reaktivních forem kyslíku a uvolňování toxických forem (viz Obr. 2). [4,10]



Obr. 2: Mechanismy toxicity nanočástic na bakterie [4]

Některé nanomateriály, jako třeba kvantové tečky nebo uhlíkové nanotrubicе, jsou záměrně navrženy pro interakci s proteiny, nukleovými kyselinami nebo buněčnými membránami za účelem podávání léků. Bakterie mohou být navrženy k cílené dopravě nanočástic. Nanočástice oxidu ceričitého může po kontaktu s živými buňkami oxidovat membránové složky podílející se na transportu elektronů a způsobit cytotoxicitu. [4]

2.2.4. Chování NM ve vodním prostředí po přidání surfaktantu

Detergenty jsou látky s čistícím a pracím účinkem. Jejich základní složkou jsou tenzidy (název je odvozen z latinského *tensio* tj. napětí, tlak) neboli surfaktanty (od sousloví *surface-active agent*), povrchově aktivní látky, které jsou amfifilní, tj. obsahují hydrofilní i hydrofobní část. Čistící účinek tenzidů spočívá v tom, že hydrofobní část jeho molekuly přilne k částice nečistoty, kdežto hydrofilní část molekuly tenzidu nečistoty vtahuje do vodního prostředí. Hydrofobní část molekuly tenzidu je uhlovodíkový zbytek (nejčastěji karboxylátový, sulfátový nebo sulfonový anion).

Detergenty vstupují do životního prostředí zejména spolu s odpadními vodami. Složení tenzidů se při vstupu do prostředí liší od jejich chemické stavby během používání v domácnostech. Většina tenzidů podléhá biologickému rozkladu. [13]

Některé vlastnosti nanomateriálů se mohou změnit přidáním surfaktantu. Surfaktanty mohou obalit nanočástici a/nebo změnit jejich tvar a povrchový náboj. Za přítomnosti surfaktantu ve znečištěném prostředí dochází ke stabilizaci nanočástic ve vodní fázi. [10]

Původně se pro stabilizaci nanočástic používal tetrahydrofuran (THF), který je řazen mezi neurotoxiny. Byly provedeny testy toxicity C_{60} fullerenu rozptýleného v tetrahydrofuranu. Toxicita nanočástic byla zvýšena o toxicitu THF, jelikož THF byl uvězněn v centru C_{60} agregátů. Jako kompromis se používají látky, které sice mají menší stabilizační schopnost, i ale jsou méně toxické, jako např. detergent dodecyl sulfát sodný (SDS) pro dispersi částic uhlíkových nanotrubic. [4,14]

Stabilní koloidní suspence nanočástic jsou předpokladem pro efektivní interakci nanočástic s řasami, což může vést k absorpci nebo k toxickým účinkům. [15]

Mechanismus stabilizace NM

Stabilizace zabráňuje nevyhnutelným srážkám malých částic, které vedou k vytvoření větších agregátů. [5]

Nejjednodušším způsob dosažení stabilních koloidních roztoků je elektrostatická stabilizace, kdy se ke stabilizaci využívá odpuzivých sil mezi povrchy stejně nabitých částic. Nevýhodou je, že může snadno dojít k opětovné destabilizaci nanočástic při změně koncentrace elektrolytu, částice ztrácejí ochranu před agregací. [3]

Nejčastěji využívaná možnost stabilizace je sterická stabilizace koloidních roztoků. Dochází k adsorpci organických molekul s dobrou rozpustností v roztoku na povrchu lyofobní částice (v roztoku nerozpustné). Nové molekuly nemohou k nanočástici pronikat přes hustou vrstvu silně adsorbovaných molekul a jejich růst se zastaví. Oproti elektrostatické stabilizaci je lepší stabilita nanočástic a necitlivost vůči změně elektrolytu roztoku. [3]

Při stericko-elektrické stabilizaci koloidních roztoků dochází ke sterické stabilizaci částice a koloidního surfaktantu, které mohou nést elektrický náboj. [3]

2.3. Toxicita nanomateriálů

Toxicita látky je schopnost způsobovat poškození organismu. U nanomateriálů míra toxicity závisí na velikosti a tvaru částic. Mohou existovat znatelné rozdíly v toxicitě nanočástic ve srovnání s částicemi velikosti mikrometrů. Menší částice způsobují větší toxicitu, která je závislá na velikosti specifického povrchu částice. [15,32]

2.3.1. Uhlíkaté nanomateriály

Toxické účinky byly zjištěny u zelených řas (*Pseudokirchnerella subcapitata*), nezmaru štíhlého (*Hydra attenuata*) [22], u perlooček (*Daphnia magna*) [22], u sladkovodních ryb (*Danio rerio*). [23]

V některých případech nanočástice adsorbují na svůj povrch organické chemikálie. [12,15] Toxicita fullerenu byla zjištěna u zelených řas (*Chlamydomonas reinhardtii*) [6], u bakterií (*Bacillus subtilis*), u perlooček (*Daphnia magna*) a u sladkovodních ryb (*Danio rerio*). [23] Deriváty fullerenu mají antibakteriální účinky a antimikrobiální účinky. [4]

2.3.2. Kovové nanomateriály a jejich sloučeniny

Ag

Nanočástice stříbra vykazuje toxicitu u sladkovodních ryb (*Danio rerio*) a dochází k bioakumulaci v organismu. Má antibakteriální účinky. [4,23]

TiO₂

Toxické účinky nebyly zjištěny u řas ani u perlooček. [5,22] V ojedinělých případech byla zjištěná toxicita u perlooček (*Daphnia magna*) [4,10] a na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*). [4,10,22,23,25] Škodlivost tohoto oxidu byla prokázána u nezmaru štíhlého (*Hydra attenuata*) [22], a také dochází k poškození povrchu buněk u sinic (*Chroococcus*). Přítomnost oxidu titaničitého zvýšila akumulaci kadmia a arsenu v kaprech. [15]

MgO

Toxické účinky byly pozorovány u bakterií (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*). [4]

ZnO

Testy toxicity došly k závěru, že nanoforma oxidu zinečnatého je více toxická než bulk forma tohoto oxidu. Toxicita této nanočástice byla prokázána u bakterií (*Bacillus subtilis*), u zelených řas (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*) a u perlooček (*Daphnia magna*). Dochází k narušení reprodukce perlooček a k úmrtnosti ryb. [6,11,23,25]. Byla pozorována snížená klíčivost semen kukuřice a snížení růstu kořenů kukuřice, hlávkového salátu, ředkviček, hořčice a jílku. [4]

CeO₂

Byl pozorován antimikrobiální účinek u bakterie *Escherichia coli*. [4] Dochází k bioakumulaci sloučenin ceru v játrech sladkovodních ryb (*Danio rerio*). [25] Zpomalení růstu bylo pozorováno u zelených řas (*Pseudokirchneriella subcapitata*) a u perlooček (*Daphnia magna*). [27] Oxid ceričitý snižuje délku života hlístic (*Caenorhabditis elegans*) tvorbou reaktivních forem kyslíku. [29]

CuO

Nanoforma oxidu měďnatého je toxičtější než bulk forma tohoto oxidu. Tento oxid je více toxický než oxid titaničitý. Toxicita byla zjištěna na bakteriích (*Vibrio fischeri*), na perloočkách (*Daphnia magna*) a na žábřonožkách (*Thamnocephalus platyurus*). [23]

2.3.3. Kvantové tečky

Toxické kovy přítomné v jádře kvantových teček nejsou biologicky dostupné pro zelené řasy a perloočky (*Ceriodaphnia dubia*). Kyselé prostředí (ve střevech organismů) usnadňuje uvolňování jádra kvantových teček a toxické expozice vodních organismů jsou nevyhnutelné. [24] Toxické účinky byly zjištěny u bakterií (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*), u sladkovodních slávek (*Elliptio complanata*) a u potkanů. [23]

3. Experimentální část

3.1. Řasový test toxicity

3.1.1. Použitý řasový kmen

Jako zkušební organismus byla použita čistá kultura sladkovodních planktonních řas ze sbírky autotrofních mikroorganismů CCALA (Culture Collection of Algal Laboratory) Botanického Ústavu AVČR, pobočka Třeboň.

Jedná se o tento kmen: *Desmodesmus subspicatus* (CHOD.)HEGEV et SCHMIDT, kmen: BRINKMANN 1953/SAG 86.81

Je to jednobuněčná řasa z oddělení Chlorophyta – zelené řasy, třída Chlorophyceae – zelenivky, řád Chlorellales (podle Ch. van der Hoeke [31])

3.1.2. Kultivace zásobní řasové kultury

Řasové inokulum pro zkoušku se odebírá z exponenciálně rostoucí kultury. Zásobní kultura byla kultivována ve 250 ml zábrusových baňkách za stálé aerace při podmínkách testu (viz Tab. III). Vzduch byl přiváděn a čištěn přes bakteriální filtr. Skleněné nádoby bylo před použitím vypáleno v peci při 300 °C a přívodní hadičky byly sterilovány autoklávováním po dobu 20 minut.

3.1.3. Živné médium

K přípravě živného média pro kultivaci řas se používá destilovaná voda. Koncentrace jednotlivých složek je uvedena v Tab. I. [19]

Pro zjednodušení práce je vhodné si nejprve připravit zásobní roztok stopových prvků (viz Tab. II), který lze za vhodných podmínek (4°C, bez osvětlení) uchovávat i řadu let. [19]

Před použitím byl dostatečný objem média sterilován v autoklávu (20 minut) a uchováván v chladu (4°C)

Tab. I: Složení média pro kultivaci sladkovodních řas

chemikálie	Koncentrace [mg/l]
NaNO ₃	467
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	59
K ₂ HPO ₄	31
MgSO ₄ ·7H ₂ O	25
Na ₂ CO ₃	21
FeCl ₃	1
	koncentrace [ml/l]
Gaffronův roztok	0,08

Tab. II: Roztok stopových prvků podle Gaffrona

Chemikálie	Koncentrace [mg/l]
H ₃ BO ₃	3100
MnSO ₄ · 4H ₂ O	2230
Na ₂ VO ₄ · 2H ₂ O	33
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	88
KBr	119
KI	83
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287
Cd(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	154
Co(NO ₃) ₂ · H ₂ O	146
CuSO ₄ · 5H ₂ O	125
NiSO ₄ · (NH ₄) ₂ SO ₄ · 6H ₂ O	198
Cr(NO ₃) ₃ · 7H ₂ O	37
V ₂ O ₄ (SO ₄) ₃ · 16H ₂ O	35
Al ₂ (SO ₄) ₃ · K ₂ SO ₄ · 24H ₂ O	474

3.1.4. Toxikant

Tab. III: Velikost a výrobce toxikantu

	velikost [nm]	výrobce
nano CeO ₂	2,1	Ústav anorganické chemie, VŠCHT Praha
bulk CeO ₂	47,7	Lachema N.P. Brno

Nanočástice CeO₂ 2,01 nm byly připraveny reakcí síranu cernatého (CeSO₄) s amoniakem (NH₃) a následným vařením 5 hodin ve vodě.

Určení velikosti nanočástic bylo provedeno RTG difrakční analýzou. Měření bylo provedeno při pokojové teplotě na přístroji X'Pert PRO θ - θ v Bragg-Brentanově parafokující geometrii s použitím vlnové délky CuK_α záření ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$, $U = 40 \text{ kV}$, $I = 30 \text{ mA}$). Pro zpracování dat byl použit program X'Pert HighScore Plus a výpočet velikostí nanočástic pomocí Scherrerovy rovnice.

3.1.5. Surfaktant

Jako surfaktant byl použit SPOLAPON AES 242, vodný roztok sodné soli ethoxysulfátu lineárního mastného alkoholu C_{12+14} s nižším stupněm oxyetylace (CTFA: Sodium Laureth-2 Sulphate). Je to bezbarvá, čirá kapalina. Patří mezi nejběžnější užívanou surovinu pro výrobu tensidových přípravků (osobní hygieny, čistících kosmetických přípravků, ale je použita i v mycích, čistících a pracích detergentech). Ředěním v destilované vodě byl připraven roztok o koncentraci 10 ml/l a do testovacích baněk byl přidáván po $0,375 \text{ ml}$. Finální koncentrace byla tedy $0,15 \text{ ml/l}$.

3.1.6. Pracovní postup

Při testování byly použity nezábrusové Erlenmayerovy baňky (25 ml), které byly před použitím vypáleny ($170 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 minut).

Byly provedeny dva typy testů, kdy při prvním testování byl použit pouze toxikant, řasová suspenze a živné médium a při druhém testování byl spolu s toxikantem přidán i surfaktant do živného média s řasovou suspenzí.

V počítači komůrce (Cyrrus II) byla stanovena koncentrace zásobní suspenze z předkultivace. Výpočtem byly stanoveny přidávané objemy živného média, roztoku toxikantu, řasové suspenze a případně surfaktantu, aby výsledný objem činil 25 ml a koncentrace řasové suspenze byla $80\,000$ buněk v 1 ml .

Při prvním testování bylo do Erlenmayerových baněk v laminárním flowbox nejprve nadávkováno živné médium, poté toxikant a pak vypočtená řasová suspenze. Toxikant byl před nadávkováním ponechán 30 minut v ultrazvukové lázni.

Vedle baněk s koncentrační řadou byla připravena i kontrolní suspenze obsahující pouze médium a inokulum.

Takto připravené baňky byly umístěny v kultivátoru (podmínky viz Tab. VI). Po 72, 120 a 168 hodinách byly odečítány koncentrace řasové suspenze pomocí počítačící komůrky Cyrrus II.

Při druhém testování byl do vzorků přidáván spolu s toxikantem i surfaktant. Byl použit stejný postup, kdy pořadí nadávkovaných objemů bylo: živné médium, surfaktant, toxikant a poté řasová suspenze. Koncentrace a přidávané objemy surfaktantu byly vždy stejné 0,15 ml/l po 0,375 ml. Vedle baněk s koncentrační řadou toxikantu byla připravena i kontrolní suspenze obsahující médium, inokulum a surfaktant. Stejně jako v předchozím testování byla připravena i kontrolní suspenze obsahující pouze médium a inokulum.

Tab. IV: Podmínky pro test toxicity na organismu *Desmodesmus subspicatus*

Testovací organismus:	<i>Desmodesmus subspicatus</i> (<i>Scenedesmus subspicatus</i>)
Stáří	Řasová suspenze pro testování se odebírá z exponenciální fáze růstu.
Sledovaná odezva:	Inhibice růstu biomasy řas.
Podmínky testu:	
Teplota	27 ± 2 °C
Osvětlení	Kontinuální, 6 000 lux, max. 10 000 lux.
Délka expozice	168 hod.
Množství testovaného roztoku	25 ml
Inokulum	80 000 buněk / ml
Počet paralelních stanovení	2
Ostatní podmínky	Bez aerace, 2 % CO ₂ v atmosféře, promíchávání řasové suspenze kontinuální na třepačce.
Chemikálie:	Testovaná látka, zředovací voda připravená podle ISO 8692.
Pomůcky a zařízení:	Kultivační nádoby: Erlenmayerovy baňky 25 ml, světelný mikroskop, počítačící komůrka Cyrrus II, autokláv, pipety, odměrné baňky, buničínové zátky.

3.1.7. Vyhodnocení výsledků

Na základě nárůstu biomasy v jednotlivých testovaných koncentracích a kontrole se sestrojí růstové křivky řas (závislost koncentrace řasové suspenze na čase). Inhibice růstu biomasy řas se vyhodnocuje integrační metodou.

Výpočet je založen na srovnání nárůstu biomasy řas v kontrole s nárůstem v jednotlivých testovaných koncentracích. Poměr mezi nárůstem v kontrolní suspenzi a v testované koncentraci se vyjádří v procentech. Získané hodnoty odpovídají inhibici celkového nárůstu biomasy v důsledku působení toxikantu během sledovaného období.

Podstata výpočtu spočívá v určení ploch pod růstovými křivkami pro jednotlivé testované koncentrace. [19]

Inhibice nárůstu řas pro danou koncentraci toxikantu se zjistí na základě porovnání ploch pod růstovými křivkami vzorku s přídavkem a bez přídavku toxikantu. Je-li tato hodnota záporná, jedná se o stimulaci. [19]

Rovnice 1 - Výpočet inhibice nárůstu biomasy řas

$$I_i = \frac{(A_c - A_i) \cdot 100}{A_c} [\%]$$

A_iprůměrná plocha pro danou koncentraci toxikantu

A_c průměrná plocha pro kontrolní vzorek, (nulová koncentrace toxikantu)

I_i inhibice nárůstu řas pro danou koncentraci toxikantu, zjištěná na základě porovnání ploch pod růstovými křivkami.

Hodnota EC 50 a příslušné 95% intervaly spolehlivosti byly získány nelineární regresí závislosti inhibice na dekadickém logaritmu koncentrace v programu GraphPad Prism 5 (verze 5.01). Hodnoty LOEC a NOEC byly získány zpracováním dat pomocí standardní metody ANOVA následovaní Dunettovým testem pomocí programu GraphPad Instat (verze 3.06). Rozdíly byly statisticky významné, když $p < 0,05$.

4. Výsledky a diskuze

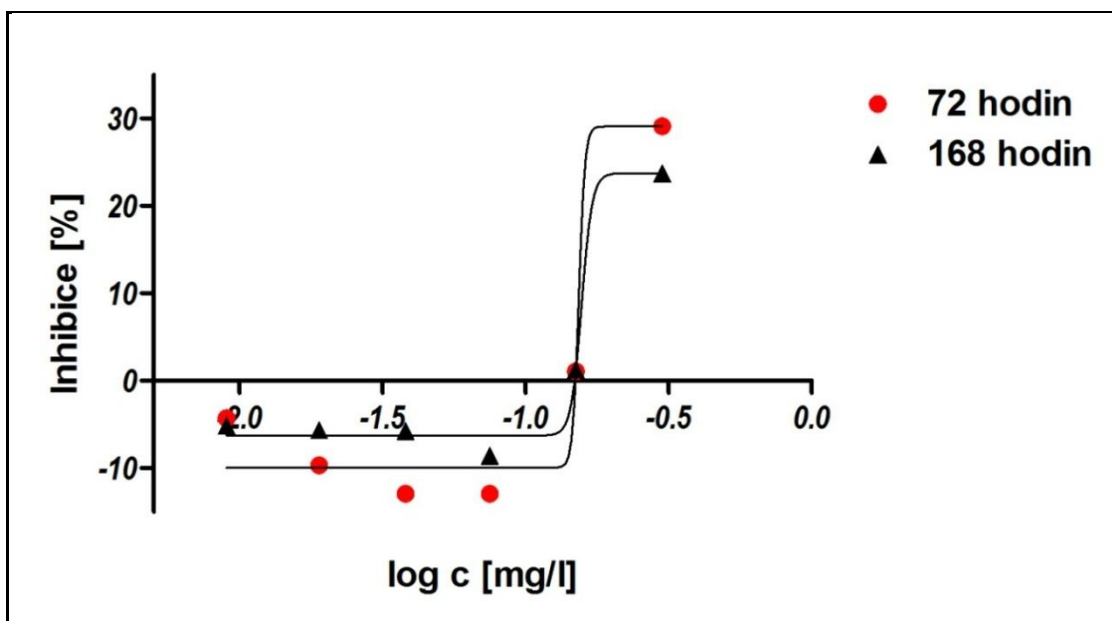
4.1. Řasový test toxicity pro surfaktant

Koncentrační řadu tvořilo nejprve šest koncentrací, nejvyšší byla 100 ml/l s faktorem dělení 2. Pomocí této koncentrační řady byl zjištěn ideální rozsah koncentrací, kde by se nedala očekávat stimulace a ani inhibice. Poté koncentrační řadu tvořilo šest koncentrací, nejvyšší byla 3,13 ml/l a také byla zjištěn ideální rozsah koncentrací bez stimulace a inhibice. V tomto rozsahu byla vytvořena koncentrační řada o sedmi koncentracích, nejvyšší byla 0,30 ml/l (viz Tab. V.).

Tab. V: Řasový test toxicity pro surfaktant

Koncentrace surfaktantu [mg/l]	Plocha pod křivkou- inhibice nárůstu řas [%]		
	72 hodin	168 hodin	Průměr
0,300	29,09	23,73	26,41
0,150	1,08	1,28	1,18
0,075	-12,93	-8,59	-10,76
0,038	-12,93	-5,77	-9,35
0,019	-9,69	-5,64	-7,665
0,009	-4,31	-5,13	-4,72

Jako nejvhodnější byla zvolena koncentrace surfaktantu 0,15 ml/l. Koncentrace 0,30 ml/l měla výrazný inhibiční efekt a koncentrace nižší jak 0,15 ml /l měla naopak stimulační efekt. Ani v dalších měřeních se neprokázal významný vliv surfaktantu na růst řas.



Obr. 3: Křivka dávka-odpověď testu toxicity pro surfaktant po 72 hodinách a po 168 hodinách

4.2. Řasový test toxicity pro 47,7 nm a 2,1 nm CeO₂

Koncentrační řadu tvořilo šest koncentrací, nejvyšší byla 150 mg/l s faktorem dělení 2,8. Při každém měření byla použita kontrola bez toxikantu. Pro každou koncentraci a kontrolu byla provedena 2 paralelní stanovení. Vyhodnocení bylo prováděno po 72, 96 a 168 hodinách. Vše bylo měřeno za stejných podmínek (viz Tab. IV).

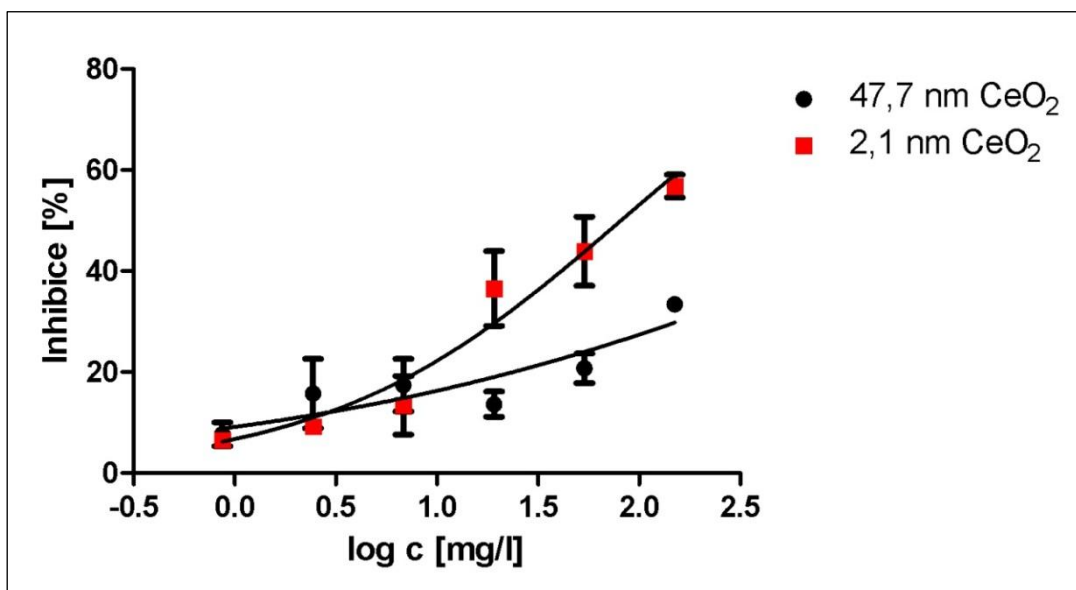
Naměřené hodnoty inhibice řasové suspenze a růstové křivky pro 47,7 nm a 2,1 nm CeO₂ jsou uvedeny v příloze (Tab. XIV, Tab. XV Obr. 8 a Obr. 9.)

Tab. VI: Shrnutí výsledků 47,7 nm CeO₂ po 72 hodin

EC50 [mg/l]	>150
i. s. 95% [mg/l]	-
R ²	-
LOEC [mg/l]	19,13
NOEC [mg/l]	6,83

Tab. VII: Shrnutí výsledků 2,1 nm CeO₂ po 72 hodinách

EC50 [mg/l]	81,22
i. s. 95% [mg/l]	50,95 – 129,5
R ²	0,9675
LOEC [mg/l]	19,13
NOEC [mg/l]	6,83



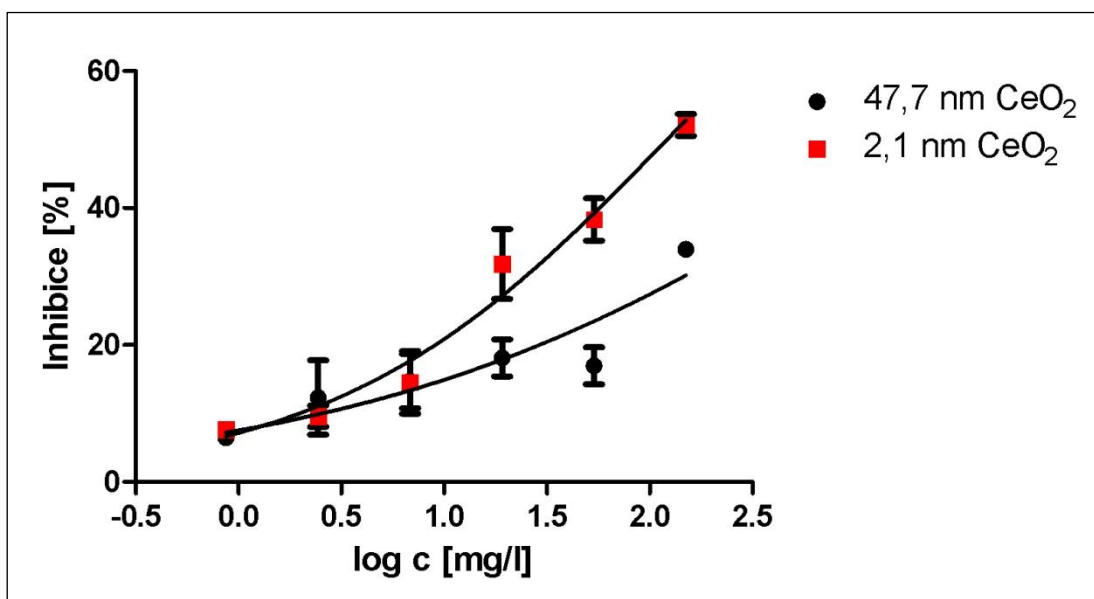
Obr. 4: Křivka dávka-odpověď testu toxicity po 72 hodinách na řasách 47,7 nm a 2,1 nm CeO₂

Tab. VIII: Shrnutí výsledků 47,7 nm CeO₂ po 168 hodinách

EC50 [mg/l]	>150
i. s. 95% [mg/l]	–
R ²	-
LOEC [mg/l]	6,83
NOEC [mg/l]	2,44

Tab. IX: Shrnutí výsledků 2,1 nm CeO₂ po 168 hodinách

EC50 [mg/l]	121.6
i.s. 95% [mg/l]	81,70 – 181,1
R ²	0,9406
LOEC [mg/l]	6,83
NOEC [mg/l]	2,44



Obr. 5: Křivka dávka-odpověď testu toxicity po 168 hodinách na řasách 47,7 nm a 2,1 nm CeO₂

Hodnotu EC₅₀ pro 47,7 nm nebylo schopno vypočítat v daném koncentračním rozsahu. Vyšší koncentrace toxikantu nebylo možné testovat z důvodu příliš vysokého zakalení vzorku, řasové buňky by tak neměly dostatek světla pro růst a inhibice by byla ovlivněna. Jak je patrné z Tab. XIV uvedené v příloze, nedochází k žádnému posunu toxicity po 72 a 168 hodinách, naměřená hodnota inhibice byla pouze nepatrně rozdílná.

Hodnota EC₅₀ pro 2,1 nm pro měření po 72 a 168 hodinách zvedla, ovšem z důvodu překryvu intervalů spolehlivosti se nejedná o statisticky významný rozdíl (Tab. VII, Tab. IX). Pravděpodobně dochází k adaptaci testovaného organismu na toxikantu.

Porovnání hodnot EC₅₀ pro 47,7 nm a 2,1 nm nelze provést, protože pro větší nanočástice nebyla tato hodnota naměřena. Výsledky potvrdily fakta uvedená v literatuře, toxicita je mírou velikosti částic. Pro menší částice je naměřená větší toxicita. Po porovnání křivek dávka-odpověď testů toxicity (viz Obr. 4, Obr. 5) je patrné, že za přítomnosti menší nanočástice má křivka strmější tvar, zvýšením koncentrace toxikantu odezva organismu stoupá s větší rychlostí.

4.3. Řasový test toxicity pro 47,7 nm a 2,1 nm CeO₂ se surfaktantem

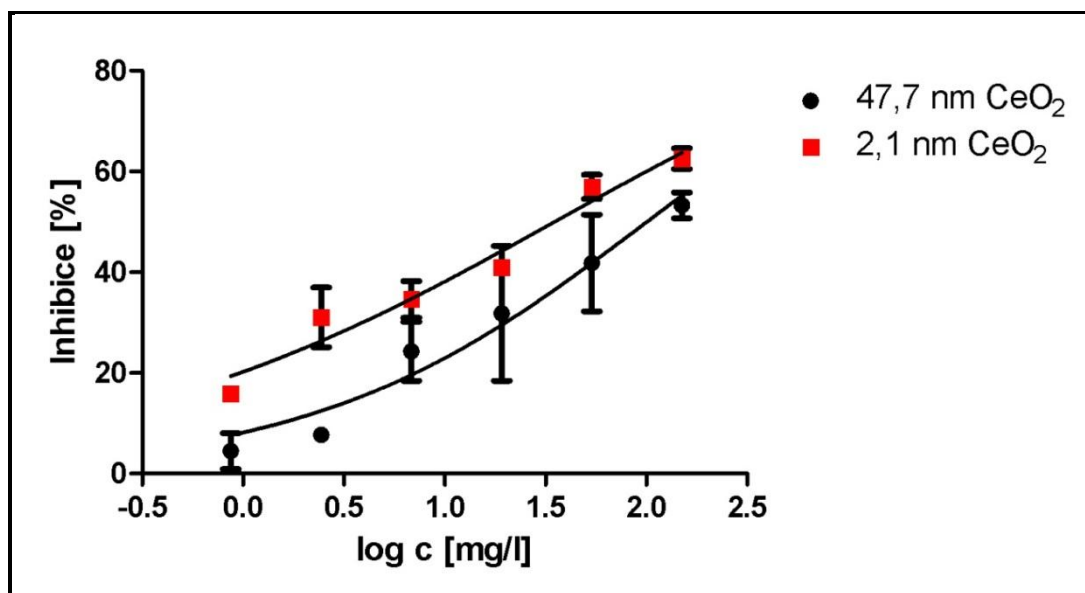
Koncentrační řadu tvořilo šest koncentrací, nejvyšší byla 150 mg/l s faktorem dělení 2,8. Při každém měření byla použita kontrola bez toxikantu a kontrola se surfaktantem. Pro každou koncentraci a kontrolu byla provedena 2 paralelní stanovení. Vliv surfaktantu na růst řasové suspenze byl zanedbatelný. Naměřené hodnoty inhibice řasové suspenze a růstové křivky pro 47,7 nm a 2,1 nm CeO₂ jsou uvedeny v Příloze (viz Tab. XVI, XVII, Obr. 10, Obr. 11)

Tab. X: Shrnutí výsledků 47,7 nm CeO₂ po 72 hodinách se surfaktantem

EC50 [mg/l]	100,5
i. s. 95% [mg/l]	47,65 – 212,1
R²	0,8181
LOEC [mg/l]	53,57
NOEC [mg/l]	19,13

Tab. XI: Shrnutí výsledků 2,1 nm CeO₂ po 72 hodinách se surfaktantem

EC50 [mg/l]	34,96
i.s. 95% [mg/l]	23,48 – 52,03
R²	0,9259
LOEC [mg/l]	0,87
NOEC [mg/l]	<0,87



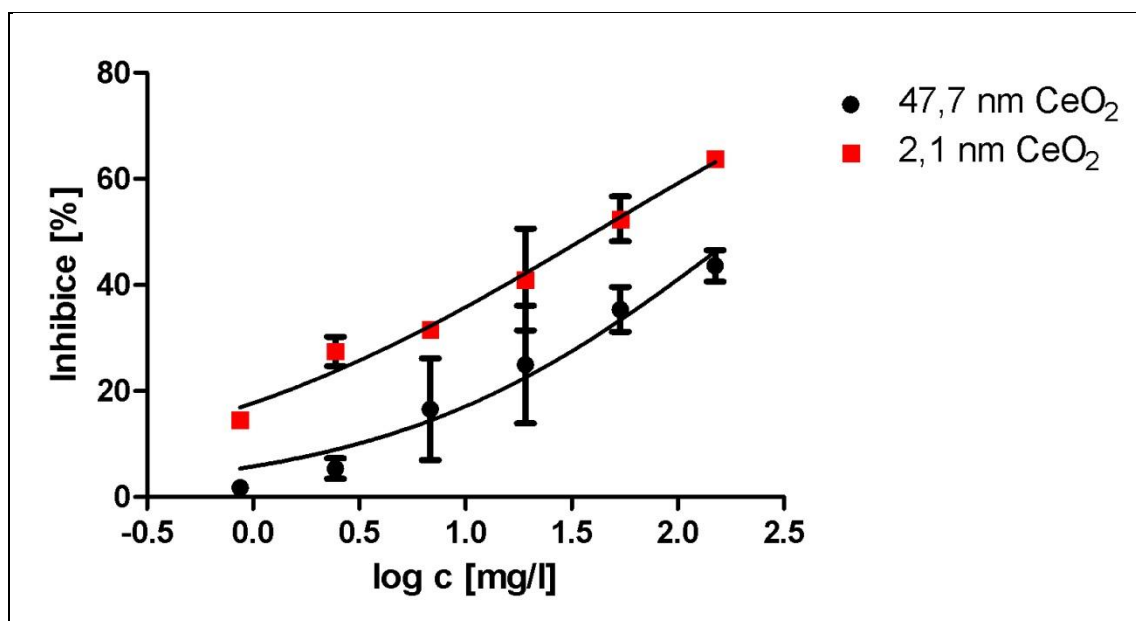
Obr. 6: Křivka dávka-odpověď testu toxicity po 72 hodinách na řasách 47,7 nm a 2,1 nm CeO₂ se surfaktantem

**Tab. XII: Shrnutí výsledků 47,7 nm
CeO₂ po 168 hodinách se
surfaktantem**

EC50 [mg/l]	198,8
i. s. 95% [mg/l]	83,18 – 475,3
R²	0,8177
LOEC [mg/l]	53,57
NOEC [mg/l]	19,13

**Tab. XIII: Shrnutí výsledků 2,1 nm
CeO₂ po 168 hodinách se
surfaktantem**

EC50 [mg/l]	40,90
i.s. 95% [mg/l]	26,63 – 62,80
R²	0,9170
LOEC [mg/l]	2,44
NOEC [mg/l]	0,87



Obr. 7: Křivka dávka-odpověď testu toxicity po 168 hodinách na řasách 47,7 nm a 2,1 nm CeO₂ se surfaktantem

Porovnáním hodnot EC50 po 72 hodinách pro obě formy nanočástic za přítomnosti surfaktantu zjistíme, že hodnoty jsou sice poměrně odlišné, ale dochází k překryvu intervalů spolehlivosti, tedy nejsou statisticky významně rozdílné (viz Tab. X, Tab. XI). Z křivky dávka-odpověď je patrné, že za přítomnosti menší nanočástice má křivka strmější tvar (viz Obr. 6). Inhibiční efekt je u menší nanočástice více patrný.

Hodnoty EC50 po 168 hodinách jsou statisticky významně rozdílné, v případě 2,1 nm nanočástice je toxický efekt na testovaný organismus větší. Pokles toxicity u menší nanočástice v průběhu času je méně výrazný, než u částice větší.

Dále je možno sledovat toxicitu nanočástice o velikosti 2,1 nm za přítomnosti a bez přítomnosti surfaktantu.

V případě měření po 72 hodinách sice hodnota EC50 klesá o více, než polovinu dochází ovšem opět k těsnému překryvu intervalů spolehlivosti a hodnoty bez surfaktantu tedy nejsou statisticky odlišné v porovnání s hodnotami se surfaktantem (viz Tab. VII, Tab. X)

Hodnoty EC50 po 168 hodinách jsou již statisticky významně odlišné. Za přítomnosti surfaktantu dochází k větší odezvě organismu a většímu inhibičnímu efektu. Surfactant pravděpodobně stabilizuje nanočástici a interakce s řasovou suspenzí je intenzivnější a naměřená toxicita větší (viz Tab. XV, Tab. XVII).

V dalším případě porovnáme nanočástici o velikosti 47,7 nm za přítomnosti surfaktantu a bez přítomnosti surfaktantu.

Pro danou koncentrační řadu bylo možné hodnotu EC50 vypočítat jen pro měření za přítomnosti surfaktantu, i zde tedy surfactant zapříčinil zvýšení toxicity.

Hodnota EC50 pro vzorek s většími částicemi za přítomnosti toxikantu v průběhu času opět stoupá, ovšem poměrně široké intervaly spolehlivosti se opět překrývají (viz Tab. XIV, Tab. XVI)

4. 4. Průběh řasového testu toxicity

Při vyšších koncentracích toxikantu se v měřeném roztoku vyskytovaly často shluky řas a toxikantu, které byly viděny i pouhým okem. Po důkladném ručním zamíchání shluky zmizely. Při vyhodnocování pomocí počítačící komůrky Cyrrus II, byly patrné malé tmavé shluky odumřelých řas a toxikantu

Při nejvyšší koncentraci nanočástice CeO_2 se surfaktantem bylo možné agregáty odumřelých řas vidět pouze mikroskopem. Odumřelé buňky byly roztroušeny jednotlivě nebo po malých skupinkách (3 až 4 buňky), na rozdíl od řasového testu bez surfaktantu (cca kolem 10 buněk).

5. Závěr

Z provedených testů toxicity vyplynulo:

- nanočástice CeO_2 velikosti 2,1 nm má větší inhibiční efekt než nanočástice CeO_2 velikosti 47,7 nm
- hodnoty EC_{50} po 72 hodinách byly menší než po 168 hodinách, dochází pravděpodobně k adaptabilitě testovaného organismu *Scenedesmus subspicatus* vůči toxikantu
- přidáním surfaktantu dochází ke stabilizaci nanočástic, interakce s řasovou suspenzí je intenzivnější a to se projeví ve větším inhibičním efektu na testovací organismus

Pomocí řasových testů toxicity bylo tedy prokázáno, že velikost částic má vliv na toxicitu, což je v souladu s informacemi uvedenými v literatuře. Zároveň byl ukázán synergický účinek surfaktantu a nanomateriálu.

Výroba a použití nanotechnologií není nijak speciálně regulována, i když se stále častěji vyskytují obavy z dopadu na životní prostředí. S rostoucím objemem využívaných nanomateriálů navíc bude i růst množství, které se dostane do životního prostředí. Určitě by měla být na místě určitá obezřetnost a opatrnost při používání nanomateriálů, dokud nenalezneme všechny informace, zda nanomateriály nepředstavují zvýšené nebezpečí pro člověka a životní prostředí.

6. Seznam použité literatury

- 1 Wang, J.; Hu Q.: Old bottle with new wine: algal indicators for nanotechnology-based toxicology. *Electronic Journal of Biology* **1**, 9-13 (2005).
- 2 Vaničková, M.; Soukupová, J.; Kvítek, L.: Nanotechnologie ve výuce přírodních věd. *Chemické Listy* **104**, 945-949 (2010).
- 3 Hošek, J.: *Úvod do nanotechnologie*. Praha, Vydavatelství ČVUT 2010.
- 4 Klaine, Stephen J.; Alvarez, Pedro J.J.; Batley, Graeme E.; Fernandes Tera F.; Handy, Richard D.; Lyon, Delina Y.; Mahendra, S.; McLaughlin, Michael J.; Lead, Jamie R.: Nanomaterials in the environment: behaviour, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**:9, 1825-1851 (2008).
- 5 Velzeboer, Ilona.; Hendriks, A. J.; Ragas, Ad M.J.: Aquatic ecotoxicity tests of some materials. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**:9, 1942-1947 (2008).
- 6 Luo, Jingyuan: Toxicity and Bioaccumulation of Nanomaterial in Aquatic Species. *The Journal of the U.S. SJWP* (2007).
- 7 Griffith, Robert J.; Luo, Jingyuan; Gao, Jie; Bonzongo, Jean-Claude; Barber, David S.: Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**:9, 1972-1978 (2008)
- 8 Harper, S.; Usenko, C.; Hutchison, J.E.; Maddux, B.L.S.; Tanguay, R.L.: In vivo biodistribution and toxicity depends on material composition, size, surface functionalisation and route of exposure. *Journal of Experimental Nanoscience* **3**:3, 195-206 (2008)
- 9 Cao, Guozhong: Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties and applications. *Imperial College Press* (2004)
- 10 Handy, Richard D.; Owen, R.; Valsami-Jones, E.: The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* **17**, 315-325 (2008)
- 11 Franklin, N.M.; Rogers, N. J.; Apte, S.C.; Batley, G.E.; Gadd, G.E.; Casey, P.S.: Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl₂ to a Freshwater Microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of Particle Solubility. *Environmental Science Technology* **41**, 8484-8490 (2007)
- 12 Wild, E.; Jones, Kevin C.: Novel method for direct visualization of in vivo nanomaterials and chemical interactions in plants. *Environmental Science Technology* **43**, 5290-5294 (2009)
- 13 Komínková, D.: *Ekotoxikologie*. Česká technika, 2008
- 14 Crane, M.; Handy, Richard D.; Garrod, J.; Owen, R.: Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology* **17**, 421-437 (2008)
- 15 Navarro, E.; Baun, A.; Behra, R.; Hartmann, Nanna B.; Filser, J.; Miao, A.; Quigg, A.; Santschi, Peter H.; Sigg, L.: Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* **17**, 372-386 (2008)

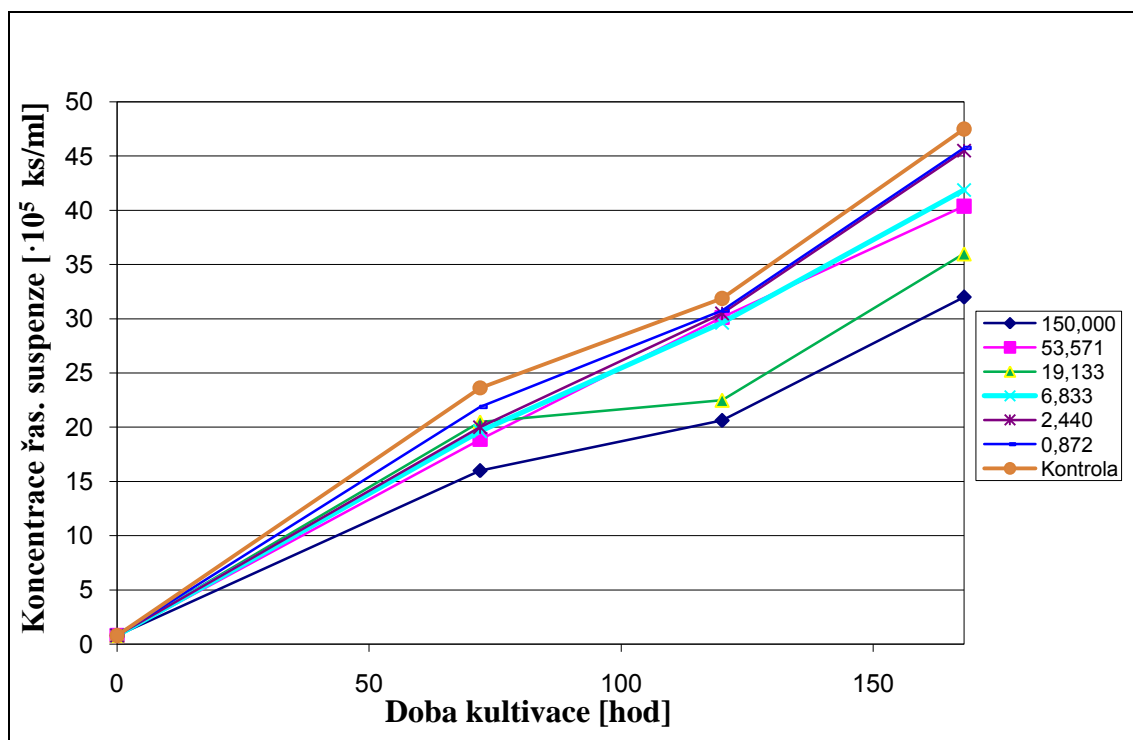
- 16 Bouldin, J.L.; Ingle, T.M.; Sengupta, A.; Alexander, R.; Hannigan, R.E.: Aqueous toxicity and food chain transfer of quantum dots in freshwater algae and *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**:9, 1958-1963 (2008)
- 17 Rogers, B.; Pennathur, S.; Adams, J.: *Nanotechnology: Understanding small systems*. CRC Press, 2008
- 18 Christian, P.; Von der Kammer, F.; Baalousha, M.; Hofmann, Th.: Nanoparticles: structure properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology* **17**, 326-343 (2008)
- 19 SOP 07 - Řasový mikrobiotest, Standardní operační postup Laboratoře ekotoxikologie a LCA, Ústav chemie ochrany prostředí, VŠCHT Praha, 2007
- 20 Pouchlý, J.: *Fyzikální chemie makro-molekulárních a koloidních soustav*. Praha, Vydavatelství VŠCHT 2008.
- 21 Kannangara, K.; Simmons, M.; Smith, G.; Raguse, B.; Wilson, M.: *Nanotechnology: Basic science and emerging technologies*. CRC Press, 2002
- 22 Blaise, C.; Gagné, F.; Férard J.F.; Eullaffroy, P.: Ecotoxicity of selected nanomaterials to aquatic organisms. *Environmental Toxicology* **23**, 591-598 (2008)
- 23 Farré, M.; Gajda-Schranz, K.; Kantiani, L.; Barceló, D.: Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**, 81-95 (2009)
- 24 Bouldin, J. K.; Ingle, T. M.; Sengupta, A.; Alexander, R.; Hannigan, R. E.; Buchanan, R. A.: Aqueous toxicity and food chain transfer of quantum dots in freshwater algae and *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**, 1958-1963 (2008)
- 25 Johnston, B. D.; Scown, T. M.; Moger, J.; Cumberland S. A.; Baalousha, M.; Linge, K.; Aerle van R.; Jarvis, K.; Lead, J. R.; Tyler, C. R.: Bioavailability of nanoscale metal oxides TiO₂, CeO₂, and ZnO to Fish. *Environmental Science Technology* **44**, 1144-1151 (2009)
- 26 Quik, J. T. K.; Lynch, I.; Hoecke, van K.; Miermans, C. J. H.; Schamphelaere, K.A.C.; Janssen, C. R.; Dawson, K. A.; Stuart, M. A. C.: Effect of natural organic matter on cerium dioxide nanoparticles settling in model fresh water. *Chemosphere* **81**, 711-715 (2010)
- 27 Hoecke, van K.; Quik, J. T. K.; Mankiewicz-Bozcek, J.; Schamphelaere, K. A. C.; Elsaesser, A.; Meeren, P.; Barnes, C.; Mckerr, G.; Howard, C. V.; Rydzyński, K.; Dawson, K.A.; Salvati, A.; Lesniak, A.; Lynch, I.; Silversmit, G.; Vincze, L.; Janssen, C. R.: Fate and effects of CeO₂ nanoparticles in aquatic ecotoxicity tests. *Environmental science technology* **43**, 4537-4546 (2009)
- 28 French, R. A.; Jacobson A. R.; Kim, B.; Isley, S. L.; Penn, R. L.; Baveye, P. C.: Influence of ionic strength, pH, and cation valence on aggregation kinetics of titanium dioxide nanoparticles. *Environmental science technology* **43**, 1354-1359 (2009)
- 29 Zhang, H.; He, X.; Zhang, Z.; Zhang, P.; Li, Y.; Ma, Y.; Kuang, Y.; Zhao, Y.; Chai, Z.: Nano-CeO₂ exhibits adverse effects at environmental relevant concentrations. *Environmental science technology* **45**, 3725-3730 (2011)

- 30 Keller, A. A.; Wang, H.; Zhou, D.; Lenihan, H. S.; Cherr, G.; Cardinale, B. J.; Miller, R.; Ji, Z.: Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environmental Science Technology* **44**, 1962-1967 (2010)
- 31 Kalina, T.: *Systém a vývoj sinic a řas*. Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, Praha 1995

7. Příloha

7.1. Řasový test toxicity pro 47,7 nm a 2,1 nm CeO₂

7.1.1. Řasový test toxicity 47,7 nm CeO₂

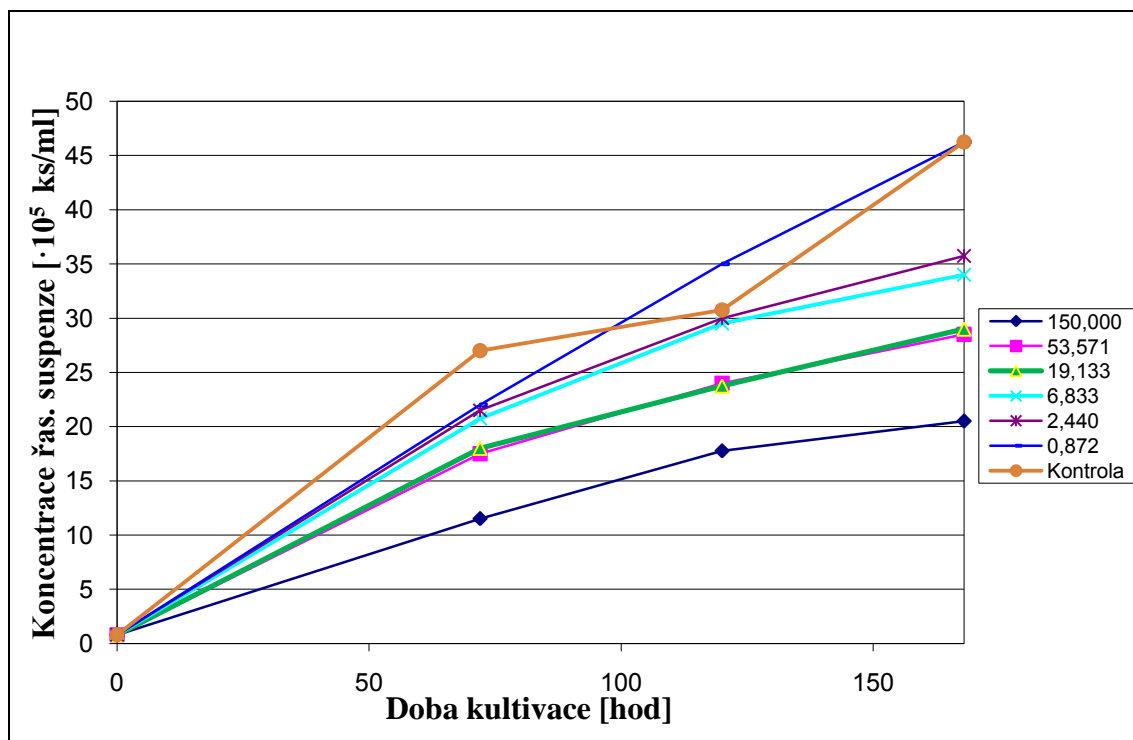


Obr. 8: Závislost koncentrace řasové suspenze na době kultivace pro 47,7 nm CeO₂

Tab. XIV: Inhibice nárůstu řas pro 47,7 nm CeO₂

Koncentrace toxikantu [mg/l]	Plocha pod křivkou - inhibice nárůstu řas [%]					
	72 hodin			168 hodin		
	A	B	Průměr měření	A	B	Průměr měření
150	34,52	32,33	33,43	33,27	34,71	33,99
53,57	17,82	23,71	20,77	14,28	19,66	16,97
19,13	11,14	16,16	13,65	15,41	20,84	18,13
6,83	12,25	22,63	17,44	10,77	18,72	14,75
2,44	8,91	22,63	15,77	6,90	17,77	12,34
0,87	10,02	5,39	7,71	7,23	5,72	6,48

7.1.1. Řasový test toxicity 2,1 nm CeO₂



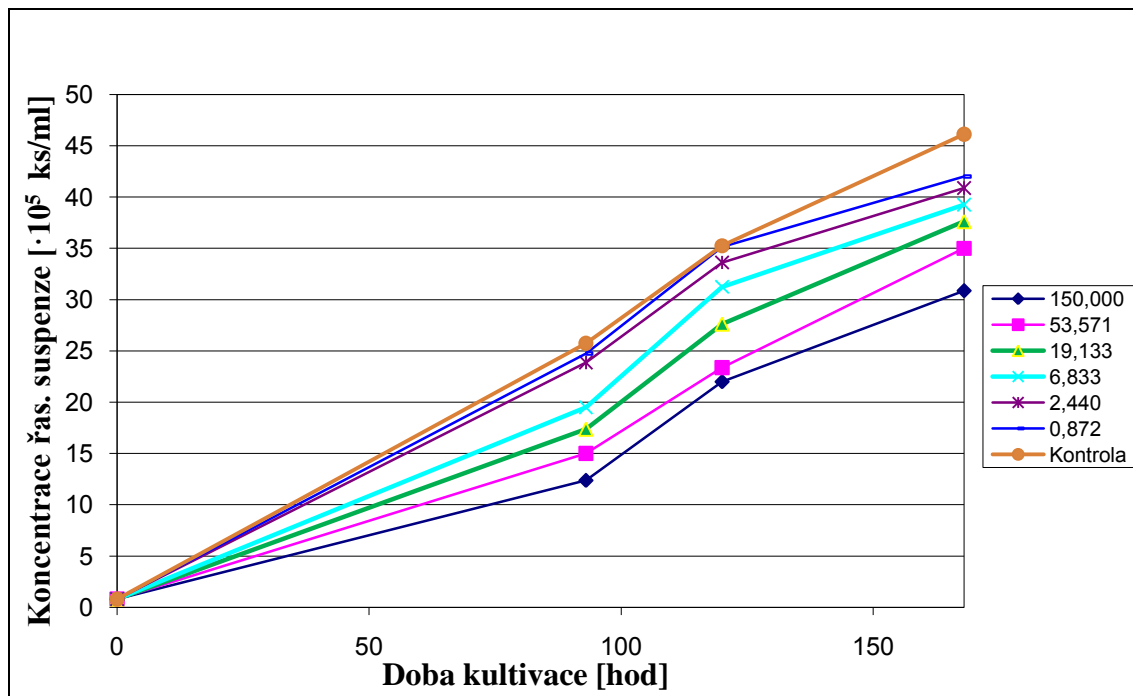
Obr. 9: Závislost koncentrace řasové suspenze na době kultivace pro 2,1 nm CeO₂

Tab. XV: Inhibice nárůstu řas pro 2,1 nm CeO₂

Koncentrace toxikantu [mg/l]	Plocha pod křivkou - inhibice nárůstu řas [%]					
	72 hodin			168 hodin		
	A	B	Průměr měření	A	B	Průměr měření
150	54,57	59,07	56,82	50,54	53,72	52,13
53,57	50,76	37,08	43,92	41,41	35,21	38,31
19,13	29,19	43,96	36,58	26,74	36,94	31,84
6,83	7,61	19,23	13,42	9,96	19,15	14,56
2,44	8,88	9,62	9,25	8,09	11,17	9,63
0,87	7,61	5,49	6,55	7,2	8,25	7,73

7.2. Řasový test toxicity pro 47,7 nm a 2,1 nm CeO₂ se surfaktantem

7.2.1. Řasový test toxicity 47,7 nm CeO₂ se surfaktantem

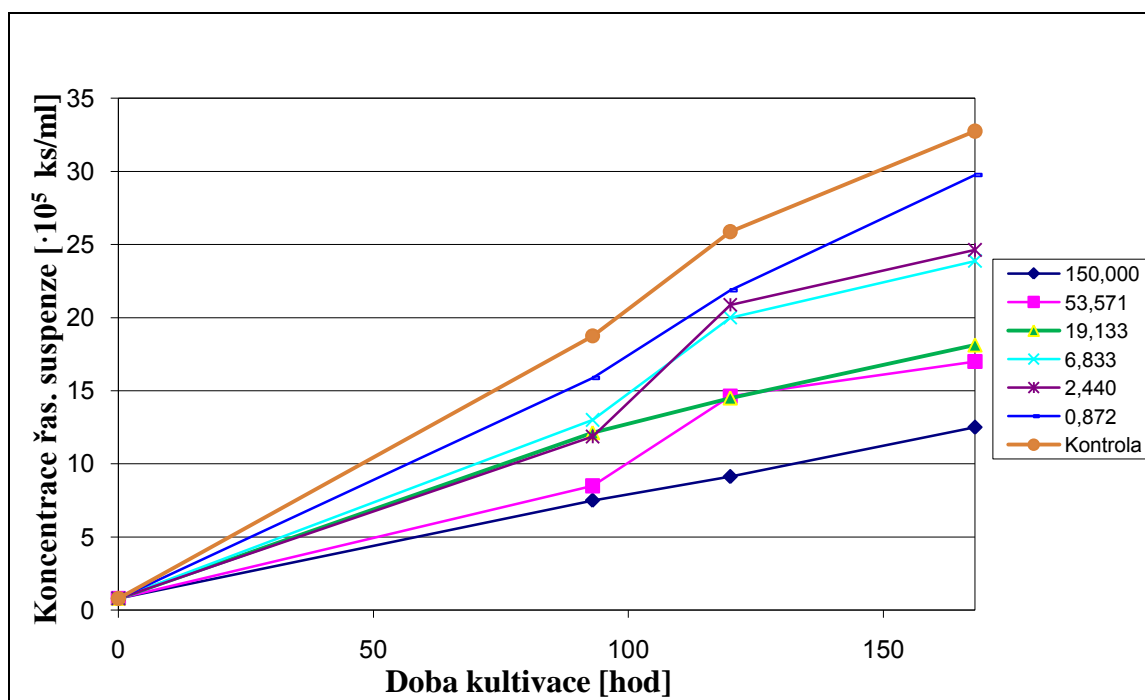


Obr. 10: Závislost koncentrace řasové suspenze na době kultivace pro 47,7 nm CeO₂ se surfaktantem

Tab. XVI: Inhibice nárůstu řas pro 47,7 nm CeO₂ se surfaktantem

Koncentrace toxikantu [mg/l]	Plocha pod křivkou - inhibice nárůstu řas [%]					
	72 hodin			168 hodin		
	A	B	Průměr měření	A	B.	Průměr měření
150	50,69	55,85	53,27	40,63	46,59	43,61
53,57	32,26	51,42	41,84	31,16	39,63	35,39
19,13	18,43	45,21	31,82	13,88	36,09	24,99
6,83	18,43	30,14	24,29	6,94	26,15	16,55
2,44	9,21	6,21	7,71	3,41	7,31	5,36
0,87	8,06	0,89	4,48	1,01	2,46	1,74

7.2.2. Řasový test toxicity 2,1 nm CeO₂ se surfaktantem



Obr. 11: Závislost koncentrace řasové suspenze na době kultivace pro 2,1 nm CeO₂ se surfaktantem

Tab. XVII: Inhibice nárůstu řas pro 2,1 nm CeO₂ se surfaktantem

Koncentrace toxikantu [mg/l]	Plocha pod křivkou - inhibice nárůstu řas [%]					
	72 hodin			168 hodin		
	A	B	Průměr měření	A	B	Průměr měření
150	60,47	64,64	62,56	62,66	65,02	63,84
53,57	54,57	59,37	56,97	56,69	48,23	52,46
19,13	39,82	42,22	36,60	31,46	50,61	40,53
6,83	30,97	38,26	31,67	30,44	32,69	28,71
2,44	25,07	36,94	38,38	24,73	30,21	30,84
0,87	14,74	17,1	15,92	14,50	14,68	14,59